第6卷 第4期
1985年11月
动物学研究
ZOOLOGICAL RESEARCH
Vol. 6, No. 4
Nov., 1985

浙江蝮蛇蛇毒类凝血酶在家兔体内的抗凝作用的研究

蒋芝萍 *管利丰 蒋克贤 *张 厦
**支立民 **王鸿利 *戚正武
（卫生部上海生物制品研究所）

摘 要

浙江产蝮蛇（*Agkistrodon halys* Pallas）毒类凝血酶经静脉注射家兔（0.25毫克/公斤）可使血浆凝血酶时间显著延长，这是由于血浆纤维蛋白原的水平下降及其性质上的变化引起的。表现在对Ristocetin的亲合力显著降低。此凝血酶时间之延长可被甲苯胺兰部分纠正。葡萄球菌猬集试验表明体内有大量纤维蛋白降解产物（FDP）产生。体外实验表明该酶不激活FXIII。

上述结果说明，类凝血酶的体内抗凝作用除由于纤维蛋白原含量降低及性质上有变化外，还与给药后体内大量纤维蛋白降解产物的形成有关。

关键词 蝮蛇 类凝血酶 抗凝作用 蛇毒

许多蝮亚科毒蛇蛇毒中含有类凝血酶活性成份。其中某些已被分离纯化。与凝血酶相似，它可直接作用于纤维蛋白原（Fbg）使之凝聚；但它作用于Fbg时一般只释放血纤肽A（FPA），且不激活XIII因子，不引起纤维蛋白交联，由此生成的“微凝块”很容易被体内纤溶系统溶解。由于它不断作用于Fbg，使体内的Fbg水平降低，形成一种低凝状态，从而在体内表现出抗凝作用。国外已将其用于治疗血栓性疾病，并已制成商品。如从红口蝮蛇毒中提取的Ancrod，从美洲矛头蝮蛇毒中提取的Reptilase以及从东部菱斑响尾蛇蛇毒中提取的Crotalase等。

近年来国内对蛇毒类凝血酶的抗凝作用也进行了研究，从尖吻蝮蛇、蛇岛蝮蛇中提取的类凝血酶已被用于临床试验，取得了较好的效果。

我们曾从浙江蝮蛇（*A. halys* Pallas）毒中分离纯化了一个类凝血酶。和其他蛇毒类凝血酶不同，它作用于Fbg时除释放FPA外，还释放FPB，而且FPB先于FPA释

* 中国科学院上海生物化学研究所 **上海市瑞金医院

本文1984年5月5日收到，1984年11月12日收到修改稿。

出。考虑到尖吻蝮蛇和蛇岛蝮蛇资源有限，而浙江蝮蛇资源丰富，它的利用有更广阔的前途和经济效益。为此，我们对浙江蝮蛇毒类凝血酶在家兔体内的抗凝效果进行了观察，并对其抗凝机理进行了探讨。

材料与方法

蝮蛇毒类凝血酶的部分纯化

参照前义，取10克蛇毒，溶于含0.02MEDTA，0.005M，pH7.8磷酸缓冲液，稀释至电导与平衡液相同，上DE-32纤维素层析柱（3×100厘米），用0.01M，pH7.8磷酸缓冲液作0－0.1MNaCl直线梯度洗脱，收集具有精氨酸酯酶及凝血活力的部分，浓缩。然后再上Sephadex G－75层析柱（3.5×115厘米），用含0.2MNaCl的0.02 M NaHCO3溶液洗脱，收集活性部分，浓缩，脱盐，冻干。

类凝血酶的毒性试验

用生理盐水将上述酶制剂配成一定浓度的溶液。随机编组体重18—20克的小白鼠，每组6只，每只注射量为0.5毫升，各组每只酶的剂量分别为20，30，40微克，观察24小时后处死解剖，观察有无出血点。对照组用粗毒按10微克/0.5毫升一只剂量注射小鼠。

类凝血酶对XIII因子的作用

取抗凝血浆0.2毫升，肝素0.1毫升（0.5毫克/毫升），类凝血酶0.1毫升（2.5毫克/毫升）以及0.1毫升0.025$M$$CaCl_2$，混合后置37°C水浴保温。待形成凝块后，加5$M$尿素1毫升，观察溶解情况。对照1不加肝素和类凝血酶，用pH7.3，0.1MTris－生理盐水（Tris：生理盐水＝1：9）代替；对照2不加肝素，但加类凝血酶及pH7.3，0.1M Tris－生理盐水。

给药和采血方法

取2公斤左右的家兔10只，于用药前三天抽心血，分别测凝血酶原时间（PT），凝血酶时间（TT），白陶土部分凝血活酶时间（KPTT），纤维蛋白原（Fbg）含量以及葡萄球菌凝集试验（SCT）的正常值。用生理盐水配制成10毫升左右的类凝血酶溶液，按0.25毫克/公斤的剂量给家兔作耳静脉注射，10分钟注射完毕。用药后7、24、48小时分别采心血作上述各项指标的测定。

瑞斯托霉素（Ristocetin）亲和层析

取2.5克CNBr激活的Sepharose-4B，用500毫升0.001MHCl溶胀，洗涤。将100毫克Ristocetin溶于30毫升含0.5MNaCl的0.1M，pH9.0$NaHCO_3$-Na_2CO_3缓冲液。用10毫升上述缓冲液迅速洗涤凝胶后，将凝胶立即转移入配基溶液，于4°C旋转反应过夜。反应结束后将凝胶转移到约40毫升pH9.0的1M乙醇胺，再于室温反应2小时，最后用上述缓

冲液及含0.5MNaCl的pH4.0，0.1M醋酸缓冲液交替洗涤4—5次，装柱（1.2×8.0厘米）备用。

兔血浆约6毫升，加入2毫升Trayslol（800单位/毫克），35毫克ε氨基已酸（最终浓度0.04M），上固相化Ristocetin柱，流速约1—2毫升/小时，流出液再上柱一次，使之充分吸附。然后分别用pH7.3，0.1M磷酸缓冲液（含0.01M柠檬酸钠，0.001M EDTA，0.15MNaCl），1MNaCl（于上述缓冲液中）洗脱未吸附蛋白。最后用含8M尿素的pH7.0，0.05MTris-HCl缓冲液洗脱吸附的Fbg，透析去盐，冻干备用。

PT、TT、KPTT、SCT、Fbg定量测定以及加甲苯胺兰凝血酶时间均参照瑞金医院常规方法进行：

1.凝血酶原时间（PT）测定　取0.1毫升抗凝血浆和0.1毫升兔脑粉浸出液（150毫克兔脑粉加生理盐水2.5毫升），加于小试管内，37°C水浴保温1—2分钟，迅速加入经37°C预保温的0.025MNaCl$_2$0.1毫升，同时按动秒表，轻摇试管。当试管内液体将停止流动时，立刻记时，重复一次，取平均值。

2.白陶土部分凝血活酶时间（KPTT）测定　抗凝血浆0.1毫升，加充分混匀的白陶土部分凝血活酶试剂0.1毫升，混匀，置37°C水浴内，保温3分钟，加入经37°C预保温的0.025MCaCl$_2$0.1毫升，同时启动秒表，不断振摇试管，至白陶土颗粒变粗时，记录时间。重复一次，取平均值。

3.凝血酶时间（TT）测定　在37°C水浴中，于0.1毫升被检血浆中加0.1毫升标准化的凝血酶溶液（正常对照的人凝血酶时间为16—18秒），立即开动秒表，记录血浆凝固时间。

4.加甲苯胺兰凝血酶时间测定　在小试管中加入0.05%甲苯胺兰水溶液0.1毫升，被检血浆0.1毫升，混匀后置37°C水浴中，再加标准化的凝血酶溶液0.1毫升，记录血浆凝固时间。

5.Fbg定量测定（双缩脲法）　离心管内加0.5毫升被检血浆，9.5毫升12.5% Na_2SO_3，混匀，37°C保温15分钟，离心；沉淀物再用5毫升12.5%Na_2SO_3，洗涤一次，再次离心，弃上清液。

取10%标准白蛋白溶液稀释成五种不同浓度，各取0.05毫升，分别加1毫升生理盐水，4毫升双缩脲试剂，混匀，37°C保温15分钟后于540mμ处比色，得标准曲线。经12.5%Na_2SO_3沉淀、洗涤的样品，按上述方法加入生理盐水和双缩脲试剂，比色，根据光密度值在标准曲线上查得相应的蛋白含量。

6.葡萄球菌猬集试验（SCT）　用生理盐水连续稀释受检血清（0.1毫升）8—10管，以0.1毫升缓冲液作为阴性对照。分别加入0.05毫升金黄色葡萄球菌（约50亿个/毫升，能使含1微克/毫升纤维蛋白原的血浆产生猬集现象），强烈振荡试管2分钟后即加0.5毫升生理盐水，于室温中静置30分钟，有明显细菌猬集的最后一管为终点。如该管血清的稀释倍数为16倍，则该受检血清的FDP滴度为1：16。

结 果

类凝血酶的分离纯化

图1为蝮蛇粗毒DFAE－纤维素层析图谱。对各洗脱级份测定其精氨酸酯酶活力，合并含精氨酸酯酶活力的主峰，即为类凝血酶组分。此组分再经Sephadex G-75分离，得到一个与蛋白峰重合的精氨酸酯酶活力峰（图2），此即为部分纯化的类凝血酶。

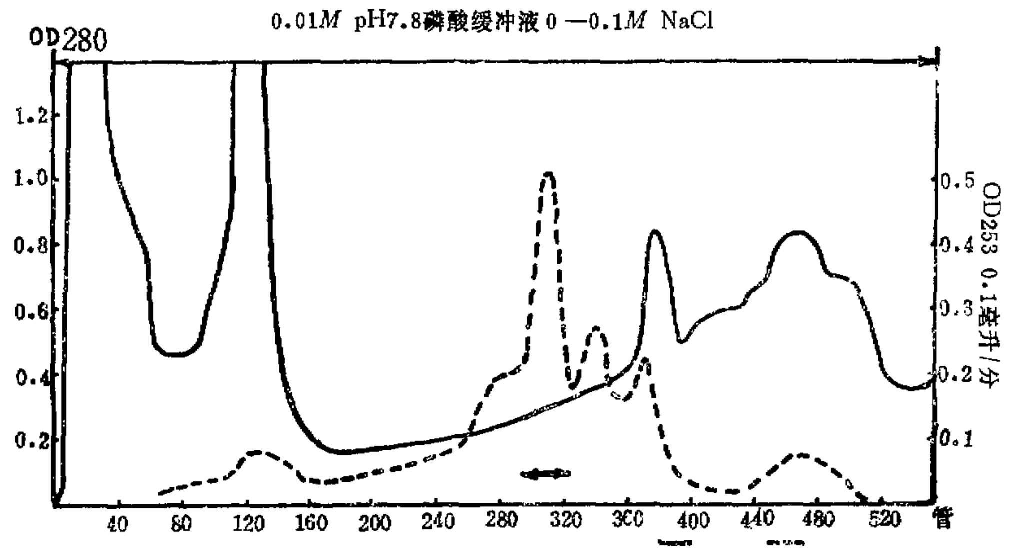


Fig. 1. Elution profile of crude A. halys venom from DE-32 cellulose column

column 3×100cm, flow rate 70ml/hr. collection 10ml/tube

——absorbance at 280nm…………activities of arginine esterase

类凝血酶的毒性试验

以粗毒注射的对照组，小鼠全部死亡。类凝血酶试验组全部存活。经解剖，胸腹腔都没有发现出血点，这表明所得的类凝血酶已去除了神经毒和出血毒。

类凝血酶对XIII因子的影响

蝮蛇毒类凝血酶作用于Fbg时，首先释放出FPB，然后是FPA，因而形成凝块所需的时间较长。这样，在蝮蛇毒类凝血酶发挥作用之前，血浆中微量被激活的凝血酶就有可能使XIII因子活化而造成假象。由于肝素对凝血酶有抑制作用，但不抑制蝮蛇毒类凝血酶，因而先加入肝素，可使凝血酶在加入蝮蛇毒类凝血酶之前即被抑制（对照2）。不加肝素和类凝血酶的对照1作为阳性对照。

实验结果，加类凝血酶和肝素的测定管于20分钟左右形成凝块，但在30分钟内可被

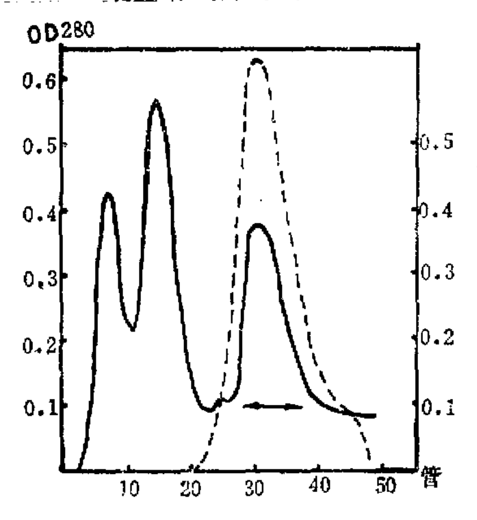


Fig. 2　Gel filtration of thrombin-like enzyme fraction on Sephadex G-75 chromatography

column 3.5×100cm, flow rate 24ml/hr collection 6ml/tube

5 *M*尿素溶解；而不加类凝血酶和肝素的对照1及加类凝血酶但不加肝素的对照2，均于3分钟内即形成凝块，且于5 *M*尿素中24小时内不溶。由此说明蝮蛇毒类凝血酶对XIII因子无激活作用。

类凝血酶对凝血系统的作用

从表1—3看出，用药7小时后，Fbg下降为正常的70%左右。TT明显延长，约为正常值的3倍，并可被甲苯胺兰部分纠正，说明蝮蛇毒类凝血酶的作用包含有类肝素物

表1　蝮蛇毒类凝血酶对家兔凝血系统的影响

时间 \ 凝血指标		PT（秒）		KPTT（秒）		TT（秒）		Fbg含量（克%）	
		平均±S.D.	P	平均±S.D.	P	平均±S.D.	P	平均±S.D.	P
用药前		6.48±0.35		22.68±1.37		18.82±1.57		0.329±0.052	
用药后	7小时	6.13±0.63	0.092	15.11±1.65	0.000	58.58±13.88	0.000	0.229±0.04	0.001
	24小时	7.95±0.45	0.000	29.83±3.51	0.000	17.56±1.25	0.158	0.34±0.028	0.623
	48小时	7.09±0.91	0.052	24.32±2.14	0.13	20.21±2.82	0.30	0.36±0.028	0.105

表2　用药7小时后TT及加甲苯胺兰凝血酶时间测定

TT（秒）	40.2	67.7	69.2	34.0	41.1	63.0	76.0	61.5	63.0	70.1
加甲苯胺兰凝血酶时间（秒）	27.2	30.0	36.0	25.0	33.2	27.3	75.0	30.0	51.0	30.2

表3　用药7小时后SCT结果

	正常	7小时	24小时	48小时
滴度	1:4～1:8	1:256～1:1024	1:32～1:256	1:8～1:16

质的影响。作SCT呈强阳性，证明这种类肝素样物质来源于降解的纤维蛋白原碎片（FgDP）。用药24小时，PT、KPTT，与正常的相比略有增高。24小时后基本恢复正常。

5 Fbg对Ristocetin的亲合力观察：

正常兔血浆中的Fbg可用固相Ristocetin吸附，然后以8 *M*尿素洗脱（图3 a）而用药7小时后的Fbg则基本上不被固相*Ristocetin*所吸附，表明它与Ristocetin的亲合性质已发生变化（图3 b）。

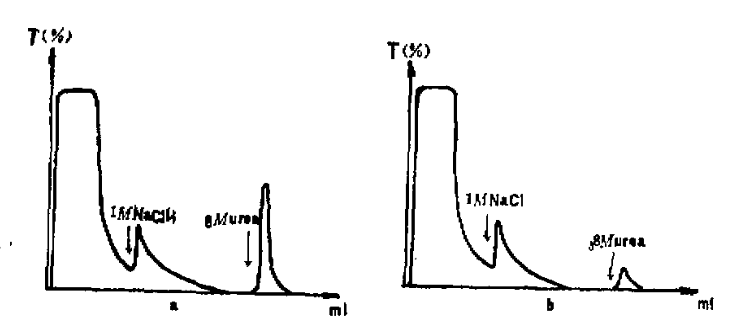


Fig. 3 Elution profile of fibrinogen from Ristocetin affinity column

Fig. a normal plasma from rabbits

Fig.b plasma from rabbits 7hr after incubation with thrombinlike enzyme

讨 论

蛇毒类凝血酶和哺乳动物凝血酶不同，它们作用于Fbg时一般只释放FPA，因而生成的纤维蛋白单体（FM）只产生直线聚合，而不引起侧向聚合。同时它们大多不作用于XIII因子，因而不产生纤维蛋白分子之间的链间交联。这样形成的纤维蛋白的凝块比较脆弱，易于受体内纤溶系统的作用而被溶解。这是类凝血酶在体内抗凝作用的理论基础之一。浙江蝮蛇毒类凝血酶和一般蛇毒类凝血酶又不同，它首先释放血纤肽B，其次才是A。尽管如此，实验证明它在动物体内也有明显的抗凝作用，说明B肽的释放与否并不是影响其抗凝作用的关键因素。最近Dyr等报道，锯鳞蝰（*Echis carinatus*）蛇毒凝血酶原转化酶Ecarin作用于Fbg时也释放出A肽和B肽，它在动物体内也可产生脱纤原作用。

动物体内给予红口蝮、尖吻蝮等蛇毒类凝血酶都有明显的脱纤原作用，用药5－7小时后，血浆中Fbg水平可降低70%左右。而浙江蝮蛇毒类凝血酶在作家兔体内抗凝观察时，用药7小时后，尽管凝血酶时间已延长至正常值的3倍，但Fbg的含量却只下降了30%左右，即Fbg的定量与凝血时间的延长不一致。其可能的解释是：用药后兔Fbg在体内受到蝮蛇毒类凝血酶的部分降解，影响纤维蛋白的聚合能力。现在已知Fbg有二列结构区域参与聚合作用，其中一列位于Aα链N端第17—19区域和γ链C端第313—410

区域内。如果其中任一部位被类凝血酶所降解，Fbg就丧失聚合的功能。但由于整个分子大小变化不显著，用12.5% Na_2SO_3仍能将它们沉淀下来，因而表现出Fbg含量下降不多而TT仍明显延长的现象。

为了证实这一假设，我们观察了用药前后血浆Fbg对Ristocetin的亲合力。结果表明：正常的Fbg与Ristocetin有很高的亲合力，而用药后此种亲合力要弱得多。测定层析后两者的Fbg含量，后者要比前者低得多，约是前者的15%左右。说明体内实际失去聚合能力的Fbg低于用沉淀法定量得出的数值。将二者分别做SDS凝胶电泳，实验结果也符合上述结论。说明经过蝮蛇毒类凝血酶的作用，虽然以沉淀法测定的Fbg含量变化不大，但质却发生了很大改变。大部分Fbg分子失去了聚合能力，导致TT延长。

另一方面，Fbg被蝮蛇毒类凝血酶降解后所形成的产物FgDP也有可能抑制纤维蛋白的聚合，而使TT延长。用甲苯胺兰作纠正试验可部分纠正TT的延长，说明降解后的产物确有类肝素物质存在。进一步用SCT测得正常兔血清为1：4－1：8，而用药7小时后最低者为1：256，最高者达1：1024，说明用药后产生了大量的Fbg的降解产物，因而造成TT大大延长。

在实验中观察到PT、KPTT在7—24小时内仅略有延长，这表明在反映Fbg聚合性能上TT最敏感，亦即作为凝血因子Ⅰ的Fbg在体内变化最大。而内、外源系统中其他凝血因子基本上与正常的相接近。对类凝血酶体内抗凝机制的研究，无疑将为类凝血酶在临床应用上提供理论基础。

参 考 文 献

王婉瑜等　1982　尖吻蝮蛇毒去纤酶制剂对家兔体内抗凝作用的影响。动物学研究 3（2）：145

辽宁省蛇毒应用研究协作组　1981　蛇岛蝮抗栓酶鉴定会论文汇编

徐福燕　1979　出血性疾病：297～357。上海科技出版社

管利丰　戚正武　1982　蝮蛇（*Agkistrodon halys* Pallas）蛇毒类凝血酶的研究，Ⅰ.分离提纯及理化、酶学性质的鉴定　生物化学与生物物理学报 4（4）：303

管利丰　戚正武　1982　蝮蛇（*Agkistrodon halys* Pallas）蛇毒类凝血酶研究，Ⅱ.类凝血酶对纤维蛋白原的作用方式。生物化学与生物物理学报 4（4）：421

Dyr. J. E. *et al*; 1983 Ecarin-mediated relase of fibrinopeptides in human plasma.*Thromb. Res*, 30 (2):179

Guan, L. F. 1984 Study on the thrombin-like enzyme, preferentially releasing fibrinopeptide B, from the snake venom of Agkistrodon halys Pallas. *Thromb. Res.*, 35:301—310

Markland, F. S. & Pitkle, H. 1977 Biological activities and biochemical properties of the thrombin-like enzymes from snake venom. Chemistry and Biology of Thrombin, 1977, 71, Hundblad, R. L. *et al*. (eds) Ann Arbor Science, Michiban

Olexa, S. A. & Budzynski, A. Z. 1981 Localization of a fibrin polymerization site. *J. Biol. Chem.*, 256 (7) :3544

ANTICOAGULATION EFFECT IN VIVO OF THE THROMBIN-LIKE ENZYME FROM *AGKISTRODON HALYS* PALLAS IN RABBITS

Jiang Zhiping Guan Lifeng* Jiang Kexian Zhang Xia*
Zhi Limin** Wang Hongli** Qi Zhengwu*
(Shanghai Institute of Biological Products; Shanghai)

The thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* Pallas, at a dose of 0.25mg per kg of rabbits, i. v., caused a remarkable prolongation of plasma thrombin time which could be corrected by an addition of toloninm chloride. It was due to the decrease in the level of fibrinogen, furthermore, the nature of fibrinogen appeared to be changed substantially, demonstrated by the apparently weak affinity to immobilized ristocetin in comparison with that of the untreated animals. The staphylococcus clumping test showed a considerable degradation of fibrinogen, resulting in the formation of FDP. The experiment in vivo indicated that the enzyme did not activate factor XIII.

The results suggested that the anticoagulation effect of the enzyme was involved in both the qualitative and quantitative change in fibrinogen and the production of FDP after injection of this enzyme.

Key words *Agkistrodon halys* Pallas Thrombin-like enzyme Anticoagulation Snake venom

* Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica
**Rui-jin Hospital attached to Shanghai Second Medical College